

РОЛЬ МЁРТВЫХ КЛЕТОК В КОЛЛЕКТИВНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К СТРЕССУ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ НА ПРИМЕРЕ ДРОЖЖЕЙ

Обзор

© 2022 Н.А. Киреева^{1,2#}, К.В. Галкина^{1#}, С.С. Соколов¹, Д.А. Кнорре^{1*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: knorre@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.10.2022

После доработки 08.11.2022

Принята к публикации 08.11.2022

Дрожжи большую часть своего жизненного цикла находятся в окружении генетически идентичных клеток – своих собственных клонов. При этом приспособленность дрожжевой клетки – например, к стрессовым условиям – зависит не только от неё самой, но и от других клеток микробного сообщества. Даже если клетка теряет способность к пролиферации, она всё ещё способна защищать оставшиеся в живых клетки. Мёртвые клетки могут абсорбировать липофильные антибиотики и представлять соседним родственным клеткам питательные вещества. Более того, некоторые ферменты мёртвых клеток могут высвобождаться в окружающую среду и способствовать обезвреживанию экзогенных токсинов. Например, каталаза, разлагающая пероксид водорода, может долго оставаться активной вне клетки. Кроме того, мёртвые клетки патогенных видов дрожжей могут подавлять иммунный ответ организма-хозяина и таким образом увеличивать шансы на выживание остальных клеток в этом организме. В этом обзоре мы предполагаем, что биохимические процессы в умирающих клетках могут увеличивать устойчивость к стрессу живых родственных клеток и, таким образом, находиться под действием естественного отбора. Мы рассматриваем возможные сценарии того, как мёртвые микробные клетки могут способствовать выживанию своих сородичей, на примере одноклеточных грибов – пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В результате мы приходим к выводу, что эволюционно консервативные механизмы программируемой клеточной смерти у дрожжей, вероятно, включают раннюю пермеабиллизацию плазматической мембраны клетки, а не предполагают сохранение её целостности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: программируемая клеточная смерть, функциональная дифференциация, устойчивость к стрессу, межклеточная коммуникация, дрожжи.

DOI: 10.31857/S0320972522120090, **EDN:** NGREEQ

ВВЕДЕНИЕ

Живое многоклеточное животное обычно легко отличить от мёртвого. В случае же одноклеточных микроорганизмов (например, бактерий или дрожжей) это получается сделать далеко не всегда: в некоторых случаях оказывается сложно предсказать, сможет ли клетка

возобновить деление или уже потеряла свою жизнеспособность. В то же время жизнеспособность микроорганизмов является важным фактором в биотехнологических процессах и при тестировании противомикробных препаратов. Жизнеспособность микроорганизмов оценивают методом клоногенного анализа или с помощью красителей, которые накапливаются либо только в мёртвых, либо только в живых клетках [1]. Оба подхода имеют свои ограничения. В случае клоногенного анализа способность одноклеточных микроорганизмов к пролиферации может зависеть от специфических соединений, например, хелатирующей

Принятые сокращения: ПКС – программируемая клеточная смерть; ПМ – плазматическая мембрана; РКС – регулируемая клеточная смерть; PI – пропидий йодид.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

железо молекулы – сидерофора [2]. Таким образом, отрицательные результаты (колонии не образуются) могут быть ошибочно интерпретированы: живая клетка не будет образовывать колонии на чашках с богатой средой и агаром, в котором не оказалось необходимого ей соединения. Красители также имеют свои недостатки. Например, пропидий йодид (PI) считается специфическим красителем мёртвых клеток, но в определённых условиях он может накапливаться в живых клетках с нарушенным метаболизмом [3, 4]. Более того, подвергнутые стрессу клетки иногда начинают накапливать в цитоплазме PI лишь через несколько часов после воздействия стресса, а до этого оставаться PI-неокрашенными [5]. Это может объяснить несоответствие оценок жизнеспособности с использованием клоногенного анализа и окрашивания PI [6]. Эти примеры позволяют предположить, что микроорганизмы могут длительное время находиться в промежуточных состояниях между жизнью и смертью, когда метаболически активная клетка неспособна к дальнейшей пролиферации.

Последовательность событий в умирающей микробной клетке может регулироваться генетически. Процессы, протекающие в критически повреждённых клетках дрожжей, могут быть изменены, если в этих клетках заранее были нокаутированы «связанные со смертью» гены [5]. Этот феномен обычно называют регулируемой клеточной смертью (РКС). У дрожжей РКС может быть вызвана такими стрессами, как закисление цитоплазмы [7], тепловой шок [8], окислительный стресс и противогрибковые препараты [9]. Подробнее с информацией об индукторах РКС можно ознакомиться в недавно опубликованном обзоре Grosfeld et al. [10]. В сообществе бактерий РКС может быть адаптивным механизмом, при котором часть клеток жертвует собой ради увеличения шансов на выживание остальной части сообщества. К примеру, в условиях стресса некоторые клетки *Bacillus subtilis* формируют покоящиеся споры, в то время как остальные лизируются и становятся источником питательных веществ [11, 12]. Вопрос о том, может ли смерть микроорганизма быть запрограммированной (то есть быть вызвана слабым сигналом и усилена собственными системами клетки), до сих пор является предметом дискуссии [13]. Стратегии выживания, основанные на альтруистической программируемой смерти отдельных индивидуумов, уязвимы к «нахлебникам», которые часто появляются в сообществах клеток: например, описаны случаи «нахлебничества» в штаммах социальных

амёб [14] и у дрожжей [15]. Однако многоклеточные микробные сообщества обычно состоят из генетически идентичных клеток, находящихся пространственно в непосредственной близости друг от друга. Пространственная близость родственных клеток сокращает риск пожертвовать собой в пользу генетически чужеродных клеток и делает возможной эволюцию механизмов альтруистической кооперации [16].

Процессы, протекающие в умирающих клетках микроорганизмов, могут быть важны для выживания микробного сообщества. Роль этих процессов может быть велика, если сообщество оказалось в условиях стресса, способного убить большую часть клеток из этого сообщества. В своём обзоре мы обсуждаем биохимические процессы в микробных клетках, которые не способны к дальнейшей пролиферации. Мы рассматриваем ситуации, в которых мёртвые клетки дрожжей могут увеличивать или снижать выживание соседних клеток; для сравнения мы также приводим примеры, иллюстрирующие взаимодействие живых и мёртвых бактерий.

МИКРОБНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ ФЕНОТИПИЧЕСКИ ГЕТЕРОГЕННЫ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К СТРЕССУ

Популяция одноклеточных организмов, потомков одной клетки, может включать несколько групп клеток (субпопуляций), существенно различающихся по своему фенотипу. Так, например, в стационарной фазе культура *Saccharomyces cerevisiae* может дифференцироваться на две субпопуляции: покоящиеся и активно пролиферирующие клетки [17]. Межклеточная гетерогенность возникает из-за стохастических процессов при активации генов, цикличности процессов, протекающих в клетках, или из-за асимметричного деления клеток [18, 19]. В агрегатах дрожжевых клеток каждая клетка оказывается в уникальном микроокружении, это также может вызывать дифференцировку клеток [20, 21]. В колониях *S. cerevisiae*, например, споруляция осуществляется только в отдельных узких слоях колонии [22]. Более того, формирование колоний дрожжей сопровождается гибелью части клеток, расположенных в глубине колонии. Эта функциональная дифференцировка, приводящая к гибели клеток, регулируется аммонием и транскрипционным фактором Sok2p. Делеция гена *SOK2* меняет распределение мёртвых клеток по колонии: мёртвые клетки появляются не только в центре, но и на периферии колонии. Это снижает эффективность утилизации суб-

страта и приводит к снижению конечного размера колонии [23].

Дифференцировка микробных клеток может быть стратегией диверсификации рисков, обеспечивающей высокую скорость пролиферации одних клеток и повышенную устойчивость к стрессу других [24]. В случае стрессов умеренной силы микроорганизмы будут неизбежно окружены своими погибшими «родственниками», что может играть решающую роль в их дальнейшей судьбе. В рамках эксперимента можно изучать, как добавление мёртвых клеток влияет на физиологию и устойчивость микроорганизмов к стрессу. Такие эксперименты обсуждаются нами далее.

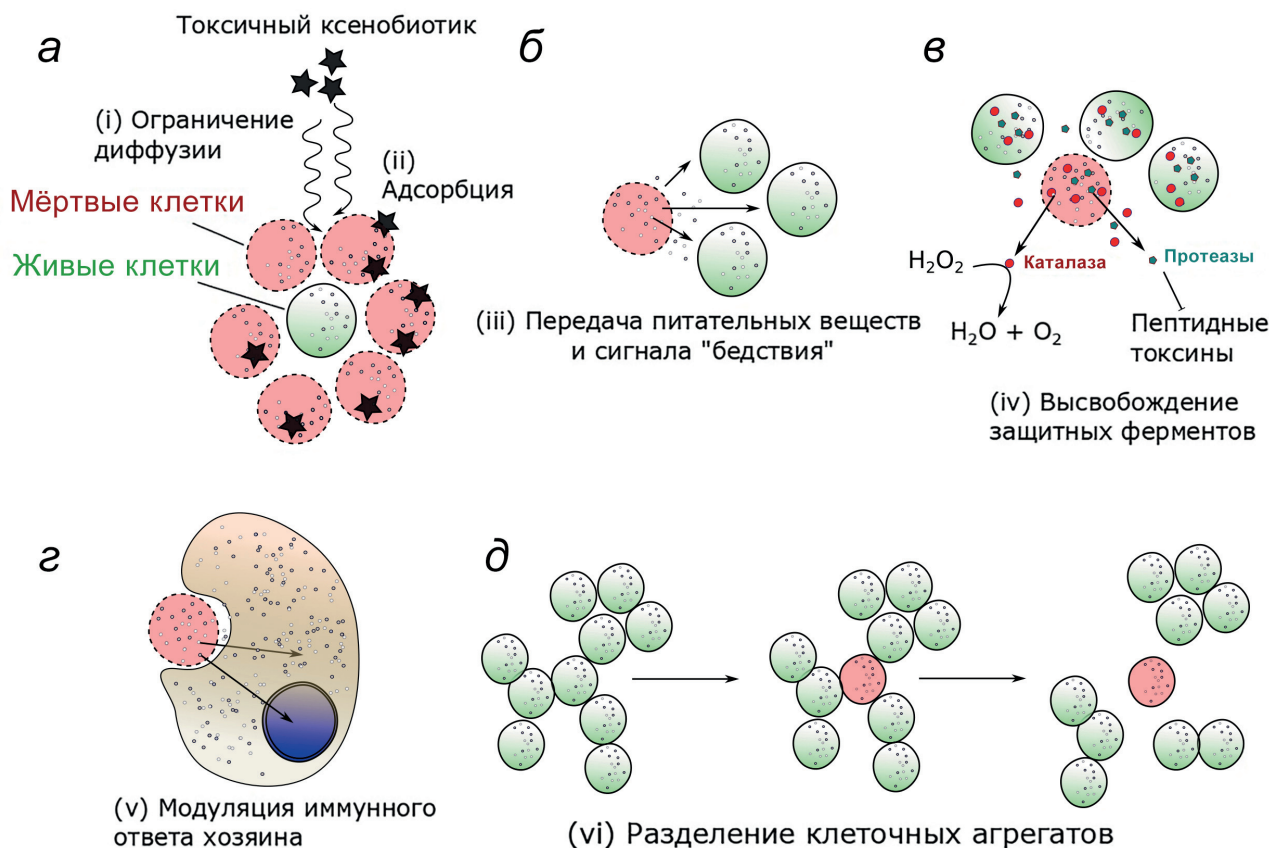
ОГРАНИЧЕННАЯ ДИФFUЗИЯ И АДСОРБЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

Клетки верхних слоёв колонии дрожжей подвергаются воздействию внешней среды и, таким образом, взаимодействуют с токсичными веществами раньше, чем клетки, расположенные в толще колонии. К примеру, этанол и антимикотик амфотерицин В (АмВ) убивают клетки внешних слоёв колоний, не затрагивая клеток внутренних слоёв [25]. По всей види-

мости, это связано с тем, что мёртвые клетки верхнего слоя предотвращают проникновение этих вредных соединений во внутренние слои колонии (рисунок, а). Поэтому способность дрожжевых клеток собираться в агрегаты повышает их устойчивость к АмВ в разы [25].

Клетки дрожжей и фрагменты клеточных стенок часто используются в качестве адсорбентов микотоксинов в сельском хозяйстве [26]. К примеру, убитые тепловым шоком дрожжевые клетки способны удалять высококанцерогенный афлатоксин М1 из молочных продуктов [27] и адсорбировать охратоксин А из натуральных виноградных соков [28]. Клеточные стенки дрожжей также уменьшают абсорбцию микотоксинов у крыс [29]. Было показано, что мёртвые клетки дрожжей снижают интенсивность воздействия токсинов дрожжевых вирусов, хотя и в меньшей степени, чем это делают живые клетки [30]. Также была показана абсорбция вирусного токсина К28 интактными дрожжевыми клетками и препаратами клеточных стенок [31].

Мы недавно показали, что мёртвые клетки дрожжей *S. cerevisiae* абсорбируют намного больше АмВ и других полиеновых макролидов, чем способны живые клетки. В соответствии с этим добавление мёртвых клеток дрожжей к



Возможная роль мёртвых клеток в защите соседних клеток (см. объяснения в тексте)

живым клеткам защищало последние от воздействия макролидных антимикотиков [32]. Данный эффект был связан с тем, что гибель клеток сопряжена с пермеабиллизацией плазматической мембраны (ПМ). Это делает возможной адсорбцию полиеновых макролидов на поверхности мембран внутренних клеточных компартментов и, таким образом, увеличивает абсорбционную способность мёртвых клеток. Эти эксперименты показывают, что мёртвые клетки дрожжей могут служить адсорбентом токсичных соединений, в то время как пермеабиллизация ПМ повышает абсорбционную способность.

МЁРТВЫЕ КЛЕТКИ МОГУТ ПРЕДОСТАВЛЯТЬ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА И ЗАЩИТНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ФЕРМЕНТЫ СОСЕДНИМ КЛЕТКАМ

Мёртвые клетки могут не только абсорбировать вредные вещества, но и высвобождать собственное содержимое в среду, снабжая питательными веществами соседние клетки (рисунок, б). К примеру, после достижения стационарной фазы в жидкой синтетической среде большая часть клеток культуры дрожжей умирает в течение нескольких дней. За счёт этого выжившие клетки получают возможность пролиферировать, используя питательные вещества, высвобождаемые из мёртвых клеток [33]. Другим примером является споруляция: ограниченная доступность питательных веществ индуцирует мейоз и образование аскоспор. В нормальных условиях клетки *S. cerevisiae* формируют аски с четырьмя спорами. Однако если при споруляции в среде наблюдается недостаточное содержание источника углерода, в аске формируется только одна или две споры, в то время как остальные лизируются [34]. Мы предполагаем, что материал погибающих спор может использоваться выжившими спорами. Следует заметить, что питательные вещества из отмирающих клеток остаются внутри мёртвых диплоидных материнских клеток, таким образом, эти вещества оказываются доступны преимущественно для выживших спор, а не для чужеродных микроорганизмов.

Пермеабиллизация плазматической мембраны делает возможным высвобождение из клетки не только низкомолекулярных соединений, например, аминокислот и нуклеотидов, но и макромолекул, таких как ДНК и белки. Поскольку большинство ферментов имеют узкий оптимум активности (например, pH) или

являются АТР-зависимыми, то обычно они становятся неактивными за пределами клетки. Однако некоторые ферменты сохраняют свою активность вне клетки в течение длительного периода времени. Например, из лабораторной практики хорошо известно, что лизированные дрожжевые клетки высвобождают протеазы и нуклеазы, способные расщеплять внеклеточные белки и нуклеиновые кислоты. Это затрудняет очистку интактных белков и нуклеиновых кислот. Чтобы противодействовать этому, в среду выделения добавляют ингибиторы протеазы или сильные детергенты. Внеклеточная протеазная активность также является проблемой в биотехнологических процессах с использованием культур дрожжей высокой плотности, нацеленных на производство белков. Для её предотвращения используют штаммы с пониженной активностью протеаз или добавляют в среду избыток аминокислот, которые часто выступают как ингибитор протеолитической активности [35]. Протеазы из мёртвых клеток могут ингибировать пептидные токсины и, таким образом, играть защитную роль в естественных сообществах дрожжей (рисунок, в) [36]. Например, кондиционированная среда, оставшаяся от инкубации штамма *Saccharomyces boulardii*, проявляет протеолитическую активность, ингибирующую действие пептидных токсинов *Clostridium difficile* A и B [37]. Однако мёртвые клетки теоретически могут оказывать и неблагоприятное действие на соседние клетки, разрушая или ингибируя их антитоксины. Так, мёртвые клетки могут выделять пептиды, продукты частичного протеолиза белков, которые могут конкурентно ингибировать антиксинозные протеазы. Роль мёртвых дрожжевых клеток в защите от пептидных токсинов изучена пока недостаточно хорошо.

Ещё одним примером белка, который обычно локализован в клетке, но сохраняет активность в широком диапазоне условий, является антиоксидантный фермент каталаза. Перекись водорода – распространённое защитное соединение, у многоклеточных животных она вырабатывается иммунными клетками [38]. Чтобы защититься от перекиси водорода, патогенные микроорганизмы выработали надёжную антиоксидантную защиту. Например, распространённые условно-патогенные микроорганизмы *Candida glabrata* и *Candida albicans* могут выдерживать гораздо более высокие концентрации перекиси водорода, чем *S. cerevisiae*. Их высокая устойчивость обусловлена высокой экспрессией гена каталазы *CTA1* [39]. Важно отметить, что в отличие от многих других ферментов, каталаза не зависит от АТР и

активна в широком диапазоне рН [40]. Следовательно, каталаза может вносить вклад в коллективную защиту микробного сообщества от окислительного стресса, даже если клетка мертва и целостность её ПМ нарушена (рисунок, в).

МЕЖКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ МЁРТВЫХ КЛЕТОК

Ещё одним возможным вкладом мёртвых клеток в выживание оставшихся является быстрая передача сигнала «бедствия» от умирающих клеток живым. Подобная межклеточная коммуникация («некросигнализация», necro-signaling) обнаружена у бактерий. Мёртвые клетки *E. coli* выделяют белок AscA – фрагмент периплазматического компонента откачивающей помпы с широкой субстратной специфичностью. AscA взаимодействует с живыми клетками бактерий и вызывает экспрессию генов ответа на стресс, тем самым сильно повышая их устойчивость к антибиотикам [41]. В другом исследовании добавление клеток, убитых ультразвуком, подавляло рост культуры *E. coli* в богатой среде и ингибировало экспрессию более трёхсот генов [42]. Ингибирование роста, вызванное мёртвыми клетками, может быть адаптивной реакцией, поскольку медленный рост способствует накоплению белков стрессового ответа (рисунок, б).

Для дрожжей, насколько нам известно, сигнальный каскад, индуцируемый мёртвыми клетками, пока показан не был. Однако необходимо упомянуть, что лизат дрожжевых клеток присутствует в стандартной богатой среде – YPD (yeast extract peptone dextrose medium, глюкозо-пептонно-дрожжевая среда) [43], и это может скрывать сигналы, исходящие от мёртвых клеток. К примеру, клетки дрожжей, выращенные в богатой питательной среде, содержащей дрожжевой экстракт, более устойчивы к противогрибковым препаратам, чем клетки, выращенные на синтетической среде, в которую не добавляется дрожжевой экстракт [44]. В то же время лекарственная устойчивость клеток дрожжей, выращенных в богатой среде, может быть объяснена другими факторами: например, различными липидными профилями у дрожжей, выращенных на богатых средах, и у дрожжей, выращенных на полных синтетических средах (CSM, complete synthetic media) [45]. Более того, поскольку клетки, выращенные на CSM, растут медленнее, чем клетки, выращенные на YPD, они могут оказаться более устойчивыми к некоторым другим противогрибковым препаратам [46].

Патогенные виды дрожжей могут взаимодействовать не только друг с другом, но с иммунными клетками хозяина [47]. Например, клетки *S. albicans* могут вызывать у макрофагов одну из форм программируемой клеточной смерти (ПКС) – пироптоз и, таким образом, не быть уничтоженными ими [48]. Мёртвые дрожжевые клетки также способны модулировать иммунный ответ хозяина (рисунок, г). Так, было показано, что убитые тепловым шоком клетки *S. albicans* стимулируют секрецию фактора некроза опухоли альфа (TNF-альфа) мононуклеарными клетками крови в большей степени, чем живые клетки [49]. В другой работе, напротив, было обнаружено, что мёртвые споры гриба *Aspergillus fumigatus* слабее активировали клеточный иммунный ответ, чем живые споры [50].

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ ФАКТОРОВ

ПКС многоклеточных животных и растений защищает хозяина, предотвращая распространение вирусов на соседние клетки. В ответ на это многие вирусы в ходе эволюции приобрели механизмы подавления ПКС клеток хозяина [51]. Несмотря на то что лизис хозяйской клетки является необходимой стадией жизненного цикла бактериофагов [52], преждевременная ПКС предотвращает распространение вируса в бактериальной популяции, поскольку в этом случае бактериальные клетки лизируются до того, как произойдёт сборка функционально активных фагов [53]. Дрожжевые клетки также могут быть носителями вирусов. Например, двуцепочечные РНК-вирусы семейства Totiviridae придают клеткам *S. cerevisiae* киллерный фенотип – способность вызывать гибель соседствующих клеток [54]. У пекарских дрожжей хорошо изучены три вирусных токсина – K1, K2 и K28. Токсины K1 и K2 нарушают целостность мембраны, в то время как K28 блокирует клеточный цикл [55]. Примечательно, что нет никакого доказательства внеклеточной передачи двуцепочечных РНК-вирусов дрожжей. Это говорит о том, что они сильно зависят от благополучия своих дрожжевых клеток-хозяев [56]. Было показано, что киллерные токсины могут индуцировать клеточную смерть [57]. Однако поскольку вирусы могут передаваться другим клеткам только во время спаривания, остаётся неясным, в каких условиях механизм индуцированной киллерным токсином клеточной смерти может быть полезен. Насколько нам известно, в настоящее время нет данных о

том, что регулируемый лизис дрожжевых клеток как-то препятствует или способствует распространению вирусов в популяции.

РАЗДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТОВ

Существует ещё один необычный случай, при котором клеточная смерть дрожжей способствует пролиферации дрожжевых клеток в суспензионной культуре. В эволюционном эксперименте Ratcliff et al. [58] штамм *S. cerevisiae*, образующий флоккулы, со временем увеличивал частоту спонтанной гибели клеток. При этом смерть отдельных клеток помогала клеточным кластерам отделиться от более крупных клеточных агрегатов (рисунок, д). Это позволило эволюционировавшей линии со спонтанной гибелью отдельных клеток иметь большую скорость набора биомассы по сравнению с исходной линией [58]. Следует отметить, что отделение кластера клеток от больших клеточных агрегатов дрожжей возможно не только за счёт гибели клетки, удерживающей этот кластер в агрегате, но и за счёт активации ферментов ремоделирования клеточной стенки. Тем не менее многие виды дрожжей способны формировать сложные многоклеточные структуры и колонии со сложной морфологией [20], и мы полагаем, что мёртвые клетки могли бы предоставлять питательные вещества растущему краю колонии и способствовать лучшей аэрации внутренних слоёв колоний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выше мы обсудили, как мёртвые клетки дрожжей могут способствовать поддержанию живых клеток. Мёртвые клетки могут абсорбировать токсины (i-ii), высвободить питательные вещества (iii) и “общественно полезные” белки (iv) и влиять на иммунный ответ (v). Наконец, клеточная смерть способствует фрагментации многоклеточных агрегатов, что может быть полезно для распространения в определённых условиях (vi). Рисунок резюмирует все эти сценарии. При этом некоторые из представленных сценариев довольно спекулятивны (например, высвобождение каталазы), другие — имеют экспериментальные подтверждения (например, абсорбция макролидов).

Важным фактором в роли мёртвых клеток может быть способ их клеточной смерти и то, что произошло с клеткой до того, как она потеряла свою жизнеспособность. Например, супернатанты, полученные из клеток одно-

клеточной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, убитых мягким тепловым шоком при 50 °С, усиливают рост суспензионной культуры этих водорослей. Важно отметить, что в этом случае для развития гибели клеток потребовалось 18 ч. Между тем супернатант клеток водорослей, убитых ультразвуком, ингибировал рост суспензионной культуры [59].

Влияние мёртвых клеток на живые может зависеть от проницаемости их ПМ. У многоклеточных животных запрограммированная гибель клеток играет важную роль в поддержании тканевого гомеостаза и предотвращении неоплазии. В этих случаях клетки обычно сохраняют целостность своей ПМ, чтобы предотвратить выброс провоспалительных факторов в межклеточную жидкость [60]. Однако при некоторых типах гибели клеток, например, при пироптозе, их плазматическая мембрана проницаема на ранних стадиях ПКС [61]. Рассматривая адаптивную роль гибели клеток у дрожжей, в большинстве обсуждавшихся выше сценариев мы не находим очевидной причины для сохранения целостности их плазматической мембраны. Возможно, единственным исключением может быть регуляция иммунного ответа организма хозяина патогенными дрожжами. Напротив, быстрое разрушение плазматической мембраны усиливает абсорбцию токсинов, а также высвобождение питательных веществ и защитных ферментов. Таким образом, мы предполагаем, что, в отличие от многоклеточных животных, эволюционно консервативные механизмы запрограммированной гибели клеток у дрожжей должны включать раннюю пермеабиллизацию плазматической мембраны дрожжей.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в написании и обсуждении рукописи. Н.К. и Д.К. подготовили исходный текст. К.Г. написала абзацы о передаче сигналов мёртвыми клетками. Д.К. подготовил иллюстрацию. Все авторы отредактировали текст и утвердили окончательный вариант рукописи.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетической биологии».

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00406, для К.Г.).

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kwolek-Mirek, M., and Zadrag-Tecza, R. (2014) Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells, *FEMS Yeast Res.*, **14**, 1068-1079, doi: 10.1111/1567-1364.12202.
2. D'Onofrio, A., Crawford, J. M., Stewart, E. J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S., et al. (2010) Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria, *Chem Biol.*, **17**, 254-264, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.02.010.
3. Davey, H. M., and Hexley, P. (2011) Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide, *Environ. Microbiol.*, **13**, 163-171, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02317.x.
4. Davey, H. M. (2011) Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 5571-5576, doi: 10.1128/AEM.00744-11.
5. Stolp, Z. D., Kulkarni, M., Liu, Y., Zhu, C., Jalisi, A., Lin, S., et al. (2022) Yeast cell death pathway requiring AP-3 vesicle trafficking leads to vacuole/lysosome membrane permeabilization, *Cell Rep.*, **39**, 110647, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110647.
6. Rego, A., Ribeiro, A., Côte-Real, M., and Chaves, S. R. (2022) Monitoring yeast regulated cell death: trespassing the point of no return to loss of plasma membrane integrity, *Apoptosis*, **27**, 778-786, doi: 10.1007/s10495-022-01748-7.
7. Chaves, S. R., Rego, A., Martins, V. M., Santos-Pereira, C., Sousa, M. J., and Côte-Real, M. (2021) Regulation of cell death induced by acetic acid in yeasts, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 642375, doi: 10.3389/fcell.2021.642375.
8. Pyatrikas, D. V., Fedoseeva, I. V., Varakina, N. N., Rusaleva, T. M., Stepanov, A. V., Fedyeva, A. V., et al. (2015) Relation between cell death progression, reactive oxygen species production and mitochondrial membrane potential in fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions, *FEMS Microbiol. Lett.*, **362**, fnv082, doi: 10.1093/femsle/fnv082.
9. Phillips, A. J., Sudbery, I., and Ramsdale, M. (2003) Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14327-14332, doi: 10.1073/pnas.2332326100.
10. Grosfeld, E. V., Bidiuk, V. A., Mitkevich, O. V., Ghazy, E. S. M. O., Kushnirov, V. V., and Alexandrov, A. I. (2021) A systematic survey of characteristic features of yeast cell death triggered by external factors, *J. Fungi (Basel)*, **7**, 886, doi: 10.3390/jof7110886.
11. Claverys, J.-P., and Håvarstein, L. S. (2007) Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être, *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 219-229, doi: 10.1038/nrmicro1613.
12. Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2015) Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria, *Cell Death Dis.*, **6**, e1609, doi: 10.1038/cddis.2014.570.
13. Hardwick, J. M. (2018) Do fungi undergo apoptosis-like programmed cell death? *MBio*, **9**, e00948-18, doi: 10.1128/mBio.00948-18.
14. Strassmann, J. E., Zhu, Y., and Queller, D. C. (2000) Altruism and social cheating in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, *Nature*, **408**, 965-967, doi: 10.1038/35050087.
15. Wloch-Salamon, D. M. (2014) Sociobiology of the budding yeast, *J. Biosci.*, **39**, 225-236, doi: 10.1007/s12038-013-9344-5.
16. West, S. A., Griffin, A. S., and Gardner, A. (2007) Evolutionary explanations for cooperation, *Curr. Biol.*, **17**, R661-R672, doi: 10.1016/j.cub.2007.06.004.
17. Benbadis, L., Cot, M., Rigoulet, M., and Francois, J. (2009) Isolation of two cell populations from yeast during high-level alcoholic fermentation that resemble quiescent and nonquiescent cells from the stationary phase on glucose, *FEMS Yeast Res.*, **9**, 1172-1186, doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00553.x.
18. Raj, A., and van Oudenaarden, A. (2008) Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences, *Cell*, **135**, 216-226, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.050.
19. Knorre, D. A., Azbarova, A. V., Galkina, K. V., Feniouk, B. A., and Severin, F. F. (2018) Replicative aging as a source of cell heterogeneity in budding yeast, *Mech. Ageing Dev.*, **176**, 24-31, doi: 10.1016/j.mad.2018.09.001.
20. Granek, J. A., and Magwene, P. M. (2010) Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast, *PLoS Genet.*, **6**, e1000823, doi: 10.1371/journal.pgen.1000823.
21. Váchová, L., Stovicek, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Stěpánek, L., Kubínová, L., Palková, Z. (2011) Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies, *J. Cell Biol.*, **194**, 679-687, doi: 10.1083/jcb.201103129.
22. Piccirillo, S., and Honigberg, S. M. (2010) Sporulation patterning and invasive growth in wild and domesticated yeast colonies, *Res. Microbiol.*, **161**, 390-398, doi: 10.1016/j.resmic.2010.04.001.
23. Váchová, L., and Palková, Z. (2005) Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia, *J. Cell Biol.*, **169**, 711-717, doi: 10.1083/jcb.200410064.
24. Levy, S. F., Ziv, N., and Siegal, M. L. (2012) Bet hedging in yeast by heterogeneous, age-correlated expression of a stress protectant, *PLoS Biol.*, **10**, e1001325, doi: 10.1371/journal.pbio.1001325.
25. Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., et al. (2008) FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast, *Cell*, **135**, 726-737, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.037.

26. Xu, R., Kiarie, E. G., Yiannikouris, A., Sun, L., and Karrow, N. A. (2022) Nutritional impact of mycotoxins in food animal production and strategies for mitigation, *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, **13**, 69, doi: 10.1186/s40104-022-00714-2.
27. Gonçalves, B. L., Muaz, K., Coppa, C. F. S. C., Rosim, R. E., Kamimura, E. S., Oliveira, C. A. F., et al. (2020) Aflatoxin M1 absorption by non-viable cells of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* strains in Frescal cheese, *Food Res. Int.*, **136**, 109604, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109604.
28. Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., and Lebrihi, A. (2004) Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains, *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 1038-1044, doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02385.x.
29. Yiannikouris, A., Apajalahti, J., Siikanen, O., Dillon, G. P., and Moran, C. A. (2021) *Saccharomyces cerevisiae* cell wall-based adsorbent reduces aflatoxin B1 absorption in rats, *Toxins*, **13**, 209, doi: 10.3390/toxins13030209.
30. Da Silva, G. A. (1996) The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 112-121, doi: 10.1007/s002530050791.
31. Radler, F., and Schmitt, M. (1987) Killer toxins of yeasts: inhibitors of fermentation and their adsorption, *J. Food Prot.*, **50**, 234-238, doi: 10.4315/0362-028X-50.3.234.
32. Kireeva, N. A., Sokolov, S. S., Smirnova, E. A., Galkina, K. V., Severin, F. F., and Knorre, D. A. (2021) Adaptive role of cell death in yeast communities stressed with macrolide antifungals, *mSphere*, **6**, e0074521, doi: 10.1128/mSphere.00745-21.
33. Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L.-L., Diaspro, A., et al. (2004) Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Cell Biol.*, **166**, 1055-1067, doi: 10.1083/jcb.200404002.
34. Eastwood, M. D., Cheung, S. W. T., Lee, K. Y., Moffat, J., and Meneghini, M. D. (2012) Developmentally programmed nuclear destruction during yeast gametogenesis, *Dev. Cell*, **23**, 35-44, doi: 10.1016/j.devcel.2012.05.005.
35. Duman-Özdamar, Z. E., and Binay, B. (2021) Production of industrial enzymes via *Pichia pastoris* as a cell factory in bioreactor: current status and future aspects, *Protein J.*, **40**, 367-376, doi: 10.1007/s10930-021-09968-7.
36. Woods, D. R., Ross, I. W., and Hendry, D. A. (1974) A new killer factor produced by a killer-sensitive yeast strain, *J. Gen. Microbiol.*, **81**, 285-289, doi: 10.1099/00221287-81-2-285.
37. Castagliuolo, I., Riegler, M. F., Valenick, L., LaMont, J. T., and Pothoulakis, C. (1999) *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa, *Infect. Immun.*, **67**, 302-307, doi: 10.1128/IAI.67.1.302-307.1999.
38. Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., and Hampton, M. B. (2016) Reactive oxygen species and neutrophil function, *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 765-792, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014442.
39. Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I., et al. (2008) High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p, *Eukaryot. Cell*, **7**, 814-825, doi: 10.1128/EC.00011-08.
40. Chance, B. (1952) Effect of pH upon the reaction kinetics of the enzyme-substrate compounds of catalase, *J. Biol. Chem.*, **194**, 471-481, doi: 10.1016/S0021-9258(18)55799-9.
41. Bhattacharyya, S., Walker, D. M., and Harshey, R. M. (2020) Dead cells release a “necrosignal” that activates antibiotic survival pathways in bacterial swarms, *Nat. Commun.*, **11**, 4157, doi: 10.1038/s41467-020-17709-0.
42. Smakman, F., and Hall, A. R. (2022) Exposure to lysed bacteria can promote or inhibit growth of neighboring live bacteria depending on local abiotic conditions, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **98**, fiac011, doi: 10.1093/femsec/fiac011.
43. Sherman, F. (2002) Getting started with yeast, *Methods Enzymol.*, **350**, 3-41, doi: 10.1016/s0076-6879(02)50954-x.
44. Carlson, T., Lupinacci, E., Moseley, K., and Chandrasekaran, S. (2021) Effects of environmental factors on sensitivity of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole and amphotericin B, *FEMS Microbiol. Lett.*, **368**, fnab040, doi: 10.1093/femsle/fnab040.
45. Mahto, K. K., Singh, A., Khandelwal, N. K., Bhardwaj, N., Jha, J., and Prasad, R. (2014) An assessment of growth media enrichment on lipid metabolome and the concurrent phenotypic properties of *Candida albicans*, *PLoS One*, **9**, e113664, doi: 10.1371/journal.pone.0113664.
46. Altamirano, S., Simmons, C., and Kozubowski, L. (2018) Colony and single cell level analysis of the heterogeneous response of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **8**, 203, doi: 10.3389/fcimb.2018.00203.
47. Marcos, C. M., de Oliveira, H. C., de Melo, W. de C. M. A., da Silva, J. de F., Assato, P. A., Scorzoni, L., et al. (2016) Anti-immune strategies of pathogenic fungi, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **6**, 142, doi: 10.3389/fcimb.2016.00142.
48. Uwamahoro, N., Verma-Gaur, J., Shen, H.-H., Qu, Y., Lewis, R., Lu, J., et al. (2014) The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages, *MBio*, **5**, e00003-14, doi: 10.1128/mBio.00003-14.

49. Mukaremera, L., Lee, K. K., Mora-Montes, H. M., and Gow, N. A. R. (2017) *Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition, *Front. Immunol.*, **8**, 629, doi: 10.3389/fimmu.2017.00629.
50. Rivera, A., Van Epps, H. L., Hohl, T. M., Rizzuto, G., and Pamer, E. G. (2005) Distinct CD4⁺-T-cell responses to live and heat-inactivated *Aspergillus fumigatus* conidia, *Infect. Immun.*, **73**, 7170-7179, doi: 10.1128/IAI.73.11.7170-7179.2005.
51. Bertheloot, D., Latz, E., and Franklin, B. S. (2021) Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death, *Cell Mol. Immunol.*, **18**, 1106-1121, doi: 10.1038/s41423-020-00630-3.
52. Hampton, H. G., Watson, B. N. J., and Fineran, P. C. (2020) The arms race between bacteria and their phage foes, *Nature*, **577**, 327-336, doi: 10.1038/s41586-019-1894-8.
53. Smith, R. P., Barraza, I., Quinn, R. J., and Fortoul, M. C. (2020) The mechanisms and cell signaling pathways of programmed cell death in the bacterial world, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **352**, 1-53, doi: 10.1016/bs.ircmb.2019.12.002.
54. Schmitt, M. J., and Breinig, F. (2006) Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection, *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 212-221, doi: 10.1038/nrmicro1347.
55. Tipper, D. J., and Schmitt, M. J. (1991) Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes, *Mol. Microbiol.*, **5**, 2331-2338, doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb02078.x.
56. Buser, C. C., Jokela, J., and Martin, O. Y. (2021) Scent of a killer: how could killer yeast boost its dispersal? *Ecol Evol*, **11**, 5809-5814, doi: 10.1002/ece3.7534.
57. Ivanovska, I., and Hardwick, J. M. (2005) Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism, *J. Cell. Biol.*, **170**, 391-399, doi: 10.1083/jcb.200503069.
58. Ratcliff, W. C., Denison, R. F., Borrello, M., and Travisano, M. (2012) Experimental evolution of multicellularity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1595-1600, doi: 10.1073/pnas.1115323109.
59. Durand, P. M., Rashidi, A., and Michod, R. E. (2011) How an organism dies affects the fitness of its neighbors, *Am. Nat.*, **177**, 224-232, doi: 10.1086/657686.
60. Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., and Han, J. (2018) Plasma membrane changes during programmed cell deaths, *Cell Res.*, **28**, 9-21, doi: 10.1038/cr.2017.133.
61. Kayagaki, N., Kornfeld, O. S., Lee, B. L., Stowe, I. B., O'Rourke, K., Li, Q., et al. (2021) NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death, *Nature*, **591**, 131-136, doi: 10.1038/s41586-021-03218-7.

ROLE OF DEAD CELLS IN COLLECTIVE STRESS TOLERANCE IN MICROBIAL COMMUNITIES: EVIDENCE FROM YEAST

Review

N. A. Kireeva^{1,2*}, K. V. Galkina^{1#}, S. S. Sokolov¹, and D. A. Knorre^{1*}

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: knorre@belozersky.msu.ru*

² *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

A substantial part of yeast life cycle takes place in the communities where the cells are surrounded by their own clones. Meanwhile, yeast cell fitness depends not only on its own adaptations but also on the processes in the neighboring cells. Moreover, even if a cell loses its clonogenic ability, it is still capable of protecting surrounding cells that are still alive. Dead cells can absorb lipophilic antibiotics and provide nutrients to their kin neighbors. Some enzymes can be released into the environment and detoxify exogenous toxins. For example, cytosolic catalase, which degrades hydrogen peroxide, can stay active outside of the cell. In viable cells of pathogenic yeast species can suppress host immune responses and, in this way, boost the spread of the pathogen. In this review, we speculate that the biochemical processes in dying cells can contribute to stress resistance to the alive kin cells and therefore be a subject of natural selection. We considered the possible scenarios of how dead microbial cells can increase the survival of their kin using unicellular fungi – baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* as an example. We conclude that evolutionary conserved mechanisms of programmed cell death in yeast are likely to include a module of early permeabilization of the cell plasma membrane rather than preserve its integrity.

Keywords: regulated cell death, functional differentiation, stress resistance, cell-to-cell communication, yeast